

## 粘虫头部螢光物质紙层析与电泳研究\*

### PAPIER-CHROMATOGRAPHISCHE UND ELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE FLUORESZIERENDE STOFFE IN DEN KÖPFEN VON *LEUCANIA SEPARATA* WALKER (LEPI- DOPTERA: NOCTUIDAE)

王敏慧      周德明      馮喜昌

WANG MIN-HUI    ZHOU DE-MING    FENG XI-CHANG

(中国科学院动物研究所)

(Zoologisches Institut, Academia Sinica)

## 一、引 言

昆虫头部,特别是复眼存在着特定的螢光物质,这是近十年来一系列研究所查明的一个基本事实。对于这些螢光物质的性质和作用则正从生物化学、遗传学和生理学等几个方面进行着研究。然而直到目前为止,这方面工作的开展还很有限,并且大部分工作是以果蝇 *Drosophila melanogaster* 和粉蛾 *Ephestia kühniella* 作出的。Grossbach (1957) 曾对三十种鳞翅类昆虫的复眼及头部作了紙层析研究。其中用五种夜蛾科昆虫所作试验的结果是,他在紙层析谱上总共得到了六块较规则和较明亮的螢光斑点。我们这里所用的材料是我国为害严重的夜蛾科害虫,粘虫 (*Leucania separata* Walker)。紙层析和电泳都显示出较多的斑点。其中有些是与其他昆虫相同的,少数可能是尚未被记录过的。

## 二、材料与方 法

本项工作所取的材料主要是粘虫成虫的头部和复眼。成虫为实验室饲养的和南北各地自然界采集的(草把和糖醋液诱集的以及大田挖蛹羽化所得)<sup>1)</sup>。这些材料都是在匀浆器中用75%甲醇提取试样的,层析所用滤纸为新华一号,Whatman 一号与北京滤纸。每张28×28厘米或30×30厘米的双向层析纸上,施用五个头(或五对复眼)的提取物。此种提取物经过真空减压浓缩后直接施于纸上。层析谱的展开都是上行的并且在黑暗中进行。部分试验的全部工作过程在红光和黑暗中进行。层析温度是15—20℃和20℃恒温。我们曾试用过十几种溶剂系统,这里给出主要的结果有以下五组: A. 正丙醇:1%氨水(2:1)/4%柠檬酸钠(Merck)水溶液; B. 正丙醇:1%氨水(2:1)/正丁醇:乙酸:水(4:1:5与20:3:7); C. 正丙醇:1%氨水(2:1)/水饱和的三甲基吡啶; D. 正丙醇:1%氨水(2:1)/3%氯化铵水溶液; E. 85%甲酸:甲醇:盐酸(80:15:0.5)/4%柠檬酸钠水溶液。

\* 此项工作系粘虫种羣分析的一部分研究工作。本项研究一直得到马世骏教授的关心与支持,于此谨志谢意。

1) 本所昆虫生态室梁兴善等同志,东北、旅大、合江、内蒙、贵州、毕节、云南、丽江、福建等农科所,中南昆虫所、广西玉林农试站、峨眉、信宜、澜沧等县农业局以及其他一些单位曾提供大量粘虫标本,于此一并志谢。

液。其中分离效果最好的是系统 A。用这组溶剂系统对南北方三十几个地点的粘虫地方种群样本,作出了两百张纸层析谱。纸电泳所用材料来源同前,这里给出的结果是以旅大和徐州的标本作出的。试验主要取复眼部分,以 75% 甲醇于匀浆器中研磨提取。提取物经浓缩后直接施于纸上。所用滤纸为新华一号。电泳是在单向平卧液冷式高压电泳装置上进行的。以循环自来水通过沸程为 60—90℃ 的石油醚来吸收电泳时所产生的热。槽内温度随水温而波动于 14—18℃ 之间。我们曾试用过以下五种缓冲液: (1) pH 1.9, 甲酸:冰乙酸:水(15:10:75), 电导率 5mS。 (2) pH 4.5,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -柠檬酸缓冲液, 电导率 7mS。 (3) pH 8.4,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  缓冲液, 电导率 10mS; 池液为 40mS 电导率的  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 。 (4) pH 9.2,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  缓冲液。 (5) pH 11.5,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  缓冲液。在上述这些缓冲液中, (4) 与 (5) 由于 pH 值较高, 电渗比较严重, 以致影响分离效果, 使某些斑点位置不稳定, 因而大部分工作是以前三种缓冲液作出的。层析及电泳所得纸谱在干燥后于暗室中用 365m $\mu$  的紫外光灯检查荧光斑点, 荧光的相对亮度主要分五级, I 级极亮, V 级为明显可以看出的斑点。另外尚有一些隐约可见的斑, 但这里没有仔细描述这一类斑点。

### 三、结果与讨论

本项研究所用滤纸主要为国产新华一号, 其层析效果大致与 Whatman 一号相似。北京滤纸也可用, 但因其纸质松软, 部分亮度较小的斑点往往因扩散而不易检出。下面给出的结果主要都是用新华一号纸作出的。

溶剂系统 A 所展开的纸层析谱总共检出三十几块斑点。图 1 记录了在全部试验中出现频率较大的斑点, 其中  $A_1$ — $A_{11}$  这十一块斑点则是较规则较明亮的基本斑点, 几乎每个样本都能检出, 并且其相对量大致是稳定的。 $A_1$  在两向都具有很低的  $R_f$  值, 荧光为橙黄色, 日光下显示为鲜黄色, 亮度为 III/V 级, 一般为 IV 级。 $A_2$  荧光颜色浅淡, 一般为 V 级。

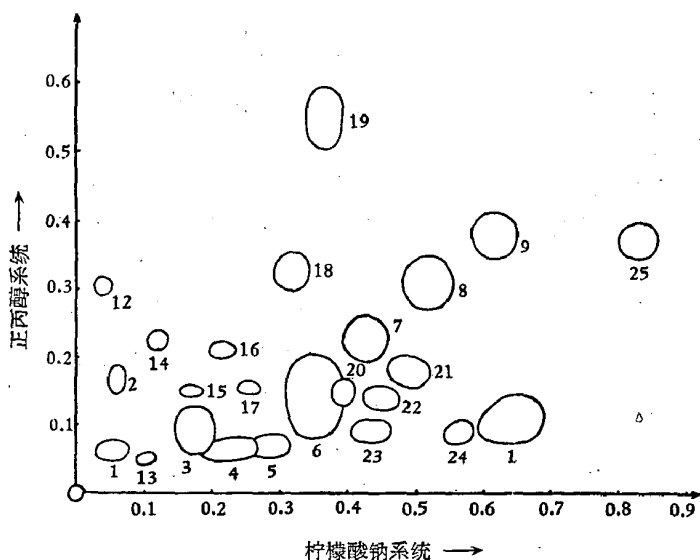


图 1 粘虫头部提取物在系统 A 所展开的层析谱上显示出的荧光斑点分布图样

A<sub>3</sub> 綠蓝色, III/V 級, 一般 IV 級。A<sub>4</sub> 在日光下及所发螢光皆呈橘紅色, 亮度为 III/IV 級。A<sub>5</sub> 暗紫蓝色, V/IV 級。A<sub>6</sub> 深蓝紫色, III/II 級。A<sub>7</sub> 綠蓝色, IV 級。A<sub>8</sub> 天蓝色, IV 級。A<sub>9</sub> 灰蓝至天蓝色, V 級。A<sub>10</sub> 亮綠蓝色, 日光下略呈黃綠色, I/II 級。A<sub>11</sub> 蓝紫色, III/V 級, 一般为 IV 級,  $R_f$  值在第一向很高, 第二向为零, 为节省篇幅起見图中未录出。这些斑点部分地相当地中海粉螟头部螢光物质层析譜上的某些斑点, A<sub>3</sub> 相当于 Or、A<sub>6</sub> 是 g、A<sub>8</sub> 是 K<sub>1</sub>、A<sub>9</sub> 是 K<sub>2</sub>、A<sub>10</sub> 是 C<sub>1</sub>(Kühn u. Egelhaaf, 1959)。斑点 A<sub>12</sub>—A<sub>25</sub> 一般为 V 級, 个别 IV 級或仅隱約可見, 其中除少数可能是降解产物外, 大部分都是头部固有物质, 并且也見于单纯复眼所作的层析譜。这里应该指出的是, 在某些样本中这些斑点的出現情况是有一定差异的。A<sub>13</sub>、A<sub>18</sub> 与 A<sub>20</sub> 为灰黄至黄色螢光斑点, A<sub>13</sub> 黄白色、V 級, 但在紅光及黑暗中的层析譜上未能检得, 它或許是一种光解产物。A<sub>18</sub> 灰黄色、V 級, 在南方样本中出現的頻率較大, 相对量也較多, 其在紙譜上的位置接近核黄素(我們曾用合成的核黄素作对照)。A<sub>20</sub> 灰黄至黄色, 日光下略呈黃綠色, 最亮可至 IV 級, 但也經常不能检到。其他斑点都略呈蓝色。A<sub>21</sub> 发綠蓝色至灰蓝色螢光, 其在层析譜上的位置很接近黃蝶呤(我們用合成的黃蝶呤作对照)。但此斑点仅于部分样本中检得, 一般在 IV 級以下, 多半 V 級。A<sub>19</sub> 螢光顏色和位置都接近狗尿酸。A<sub>23</sub> 可能是作为光解产物的蝶呤羧酸-(8)。除图 1 所录二十五块斑外, 尚有十块左右的斑点于此未作记录, 因其不很稳定或仅出現于少数乃至个别地方样本。此外, 这一系統的大量試驗表明, 复眼和全头之間的层析譜以及雌雄头部之間的层析譜不存在明显差异。

系統 B (1) (第二向正丁醇系統的比例是 4:1:5) 所展开的层析譜上可检得二十几块斑点。图 2 记录了出現頻率較大和較規則的十三块斑点。其中 B<sub>1</sub>—B<sub>9</sub> 是最基本的斑点, B<sub>1</sub> 为发黄至橘紅色的斑点, 亮度 IV 級, 在第二向  $R_f$  值很低且常与 B<sub>2</sub> 相愈合, 它可能相当于 A<sub>10</sub>。B<sub>2</sub> 发橘紅色螢光、IV 級, 相当于 A<sub>40</sub>。B<sub>3</sub> 綠蓝色、I/II 級, 相当于 A<sub>10</sub>、B<sub>4</sub> 蓝紫色, II/III 級, 相当于 A<sub>6</sub>。B<sub>6</sub> 綠蓝色、IV 級, 相当于 A<sub>70</sub>。B<sub>8</sub> 与 B<sub>7</sub> 常愈合, 有时只显示为一块斑, 天蓝色, IV/V 級, 相当于 A<sub>9</sub> 与 A<sub>80</sub>。B<sub>9</sub> 在图中未标出, 是为在两向中  $R_f$  值都很高的蓝紫色斑点, 相当于 A<sub>110</sub>。如与 Grossbach (1957) 在同样溶剂系統中的鳞翅类复眼层析結果相对照, 則 B<sub>2</sub> 相当于 b, B<sub>3</sub> 是 C<sub>1</sub>, B<sub>4</sub> 是 Isx(异黃蝶呤), B<sub>7</sub> 与 B<sub>8</sub> 是 K。B<sub>13</sub> 浅蓝紫色, 一般 V 級, 个别 III/IV 級。其余斑点皆略呈蓝色。本系統所作层析結果中某些未录出斑点仅出現于部分地方种羣样本所作层析譜, 但因所作試驗重复次数不够多, 于此暫不論及。

系統 C 所展开的层析譜上共检得二十块左右的螢光斑点。图 3 记录了其中的十五块。C<sub>1</sub> 略呈綠蓝色、IV/V 級, 可能相当于 A<sub>30</sub>。C<sub>2</sub> 綠蓝色、I/II 級, 相当于 A<sub>100</sub>。C<sub>4</sub> 浅蓝紫

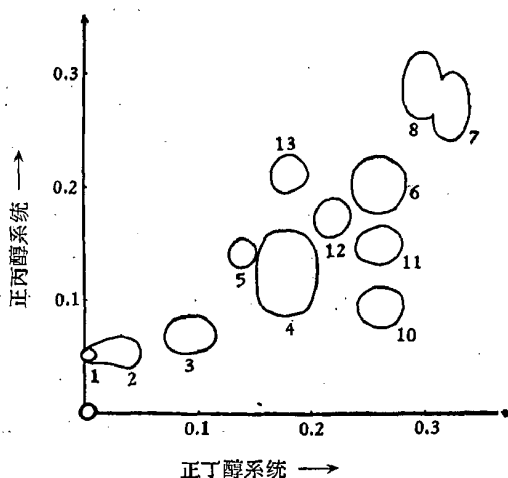


图 2 粘虫头部提取物在系統 B(1) 中所展开的层析譜上显示出的螢光斑点分布图样

色、V 級,可能相当于  $A_{50}$ 。  $C_5$  橘紅色、IV 級,相当于  $A_{40}$ 。  $C_6$  灰黃至黃色,可能相当于  $A_{10}$ 。  $C_7$  略呈藍色、V/IV 級。  $C_3$  藍紫色、III 級,相当于  $A_{60}$ 。  $C_{10}$  綠藍色、IV 級,相当于  $A_{70}$ 。  $C_{11}$  天藍色、IV/V 級,相当于  $A_{80}$ 。  $C_{12}$  灰藍色、V 級,相当于  $A_{90}$ 。  $C_{13}$  灰黃色、II 級,可能相当于  $A_{20}$ 。  $C_{14}$ 、 $C_{15}$  皆为淺藍色、V 級。

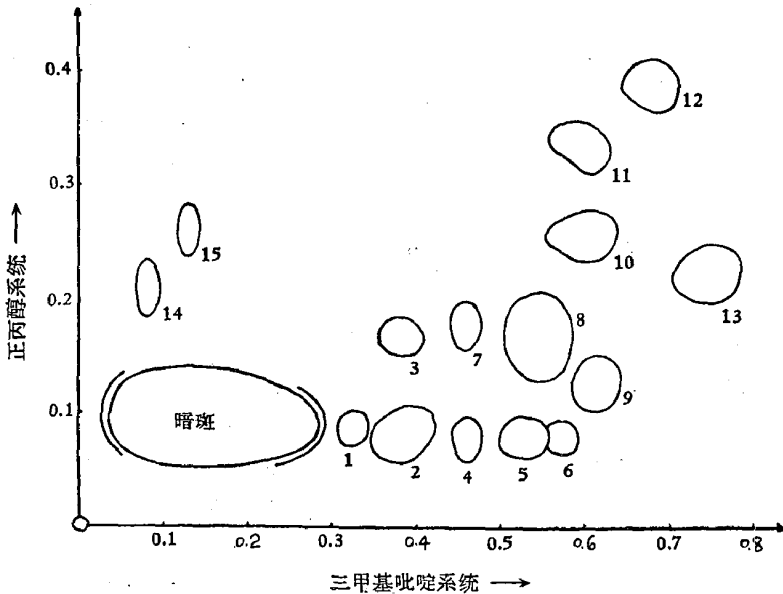


图 3 粘虫头部提取物在系統 C 所展开的层析譜上显示出的螢光斑点分布图样

系統 D 所展开的层析譜显示出与系統 A 有很相近似的基本情况,十几块主要斑点的相对位置大体是接近的。当然也有一些差异,斑点在第二向的  $R_f$  值是有变化的,其中最明显的是相当于  $A_{18}$ 、 $A_7$  和  $A_6$  的三块斑在  $NH_4Cl$  系統中有相接近的  $R_f$  值,因而縱方向几乎是在一直綫上的。此外,部分斑点在本系統中不易或不能檢到,而某些斑点則似乎更易檢出。

系統 E 所展开的层析譜只显示出五块大而明显的螢光斑点,  $R_f$  值都很高。其中三块分別是橘紅色、藍紫色和綠藍色的,相当于  $A_3$ 、 $A_6$  和  $A_{10}$ 。其位置則相当于谷螟 *Plodia interpunctella* 头部提取物在同样系統的层析中所表現出的  $b$ 、 $Isx$  (异黃蝶呤)和  $C_1$  这三块斑点(參看 Kühn 与 De Almeida, 1961)。另外两块皆是略呈藍色的斑点。

这里就給出了五个系統紙层析的基本結果。看来这几个系統在分离和檢定粘虫头部螢光物質方面是各有其一定意义的。另外一些溶剂系統的結果,因我們仍在繼續研究中,这里未曾給出。

不同 pH 值的高压紙电泳能把粘虫复眼及头部提取物分离出十几块至二十块左右的斑点,图 4 和表 1 給出了 pH 8.4、4.5 和 1.9 这三种緩冲液电泳的結果,但一部分仅隱約可見或不够稳定的斑点未曾录出,此外,石油醚(电泳时的导热介質)多少还溶去一部分螢光物質。这方面的結果也表明大約有十块以上的主要螢光斑点。其中 pH 8.4 的 +11 可能相当于 pH 4.5 的 +7 和 pH 1.9 的 -10,这也相当于层析譜中的  $A_6$ 。而前者的 +18 相当于后二者的 +6 和 -7,是为层析譜中的  $A_{10}$ 。前者的 +9 相当于后二者的 +3 和 +1,它可

能是  $A_{40}$

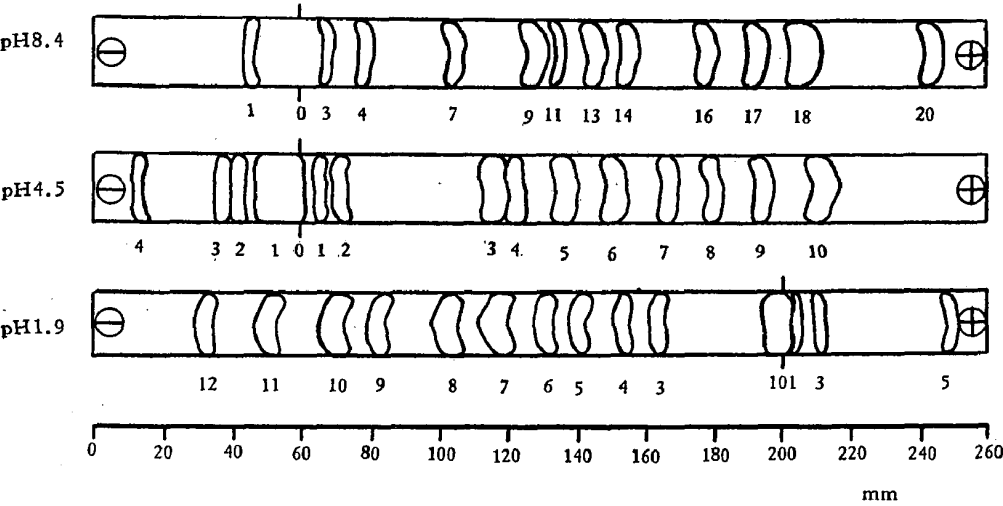


图 4 粘虫复眼提取物高压纸电泳所显示的螢光物质迁移图样

表 1 粘虫复眼提取物高压紙电泳的螢光物质检出結果

pH 值	电压梯度 (V/cm)	电流密度 (mA/cm)	电泳时间 (分)	槽内温度 (°C)	斑 点 的 颜 色 及 亮 度*													
					⊕	3 V 黄 1 IV 蓝	4 IV 黄	7 III 蓝	9 II 桔 红	11 III 蓝 紫	13 III 黄	14 III 蓝	16 III 蓝	17 IV 黄	18 I 亮 绿	20 IV 蓝		
8.4	50	4   5	80	18	⊕													
					⊕	1 V 黄	2 V 黄	3 I 桔 红	4 III 绿	5 V 蓝	6 I 亮 绿	7 III 蓝 紫	8 V 绿	9 V 蓝	10 V 黄			
					⊖	1 I 绿 蓝	2 III 蓝	3 III 蓝	4 IV 黄									
					⊕	1 II 桔 红	3 III 黄	5 V 蓝										
					⊖	1 I 亮 蓝	3 IV 黄	4 IV 绿	5 V 黄	6 IV 黄	7 I 亮 绿	8 II 绿 蓝	9 V 蓝	10 V 蓝 紫	11 V 黄	12 V 蓝		

\* 亮度相对等级所用标准较前面层析谱的低。

最后我們仅就上述結果对粘虫头部螢光物質的存在状况簡單予以綜述和討論。通过这项工作我們查明了粘虫头部有二十种以上的螢光物質。并且几乎全部集中于复眼。两性之間没有什么明显的差別。虽然这里沒有給出这些物質的吸收光譜研究結果，我們仍可以根据其螢光顏色、层析行为和电泳迁移等特性初步檢定出六块斑点。 $A_6$  是异黃蝶呤。 $A_8$  是 2-胺基-6-羥基-蝶啶。 $A_9$  是生物蝶呤。这三种蝶呤都是較普遍地存在于昆虫复眼中的。近几年来已經一再被研究者們所报导。当然  $A_9$  是否为生物蝶呤和异生物蝶呤的混合物，这是可疑的，尙待进一步查究 (Tschesche 等, 1962)。 $A_{10}$  在許多溶剂系統中层析譜上都相当于粉螟与谷螟的  $C_1$  物質，我們可以說至少它是与  $C_1$  很相近似的化合物。 $C_1$  已被檢定为 Pterhorodin，它也是一种蝶呤 (Kühn u. Egelhaaf 1959, Pfleiderer, 1963)。 $A_1$  和  $A_4$  在上述研究結果以及异丙醇: 2% 乙酸銨 (1:1) 和蒸餾水等溶剂系統中的层析行为都表現出相当于 Viscontini 与 Stielin (1962) 所研究的粉螟中的 A 物質和 C 物質。这两者已被檢定为 Lepidopterin 和紅蝶呤 (Erythropterin)。同时  $A_4$  的一些层析表現也接近 Pfleiderer (1962) 对紅蝶呤所作的研究結果。此外，从螢光顏色和层析行为来推測， $A_7$  可以被認為是結構与黃蝶呤很接近的化合物。据此，我們能够說粘虫头部的的主要螢光物質为蝶呤类的氮杂环化合物。至于地方种羣样本的比較分析方面，我們还没有足够的証据作出确切的結論。但总的說来北方地区 (东北、内蒙与华北) 的样本是比較整齐一致的，而南方地区 (华南与西南) 的样本則有較多的問題，可能在某些地方种羣以及不同季节的样本間存在着有規律的差异，但这种差异的原因是属于遺传学方面还是生态学方面的尙不能断定。总之，我們这里仅报导了关于粘虫头部螢光物質的一些初步研究結果。还有許多問題有待深入研究。最主要的是这两方面的工作，一是对这些螢光物質作出进一步的分离，檢定試驗，另一是对不同地方和季节的样本作仔細的比較分析。这些工作所获得的結果都可能对粘虫发生規律的研究有一定参考价值，因此我們認為，这方面的許多問題是應該进一步加以探究的。

### 参 考 文 献

- Grossbach, U. 1957 Zur Papierchromatographischen Untersuchung von Lepidopteren-Augen. *Z. Naturforsch.* **12b**:462—5.
- Kühn, A. & A. Egelhaaf 1959 Der rote Augenfarbstoff von *Ephestia* und *Ptychopoda*, ein Pterin-pigment. *Z. Naturforsch.* **14b**:654—9.
- Kühn, A. & F. F. De Almeida 1961 Fluoreszierende Stoffe und Ommochrome bei Genotypen von *Plodia interpunctella*. *Z. Vererbungslehre.* **92**:129—32.
- Pfleiderer, W. 1962 Pteridine, XXIV. Über die Isolierung und Struktur des orangeroten Schmetterling-pigmentes "Erythropterin". *Chem. Ber.* **95**:2195—204.
- Pfleiderer, W. 1963 Pterorhodin, ein neue natürliches Schmetterlingspigment. *Z. Naturforsch.* **18b**:420.
- Tschesche, R., B. Hess, I. Ziegler & H. Machleida 1962 Über Pteridine, XVII. Trennung von synthetischem Biopterin und Isobiopterin. *Liebigs Ann. Chem.* **658**:194—201.
- Viscontini, M. & H. Stielin 1962 Fluoreszierende Stoffe aus *Ephestia kuhniella* Zeller. 3. Mitteilung. *Helv. Chim. Acta*, **45**:2479—3487.